

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15773

研究課題名(和文) 不規則抗体が関連する遅発性溶血性輸血副作用の真の発生頻度とその原因因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of the cause factor and true frequency of irregular antibodies-associated delayed hemolytic transfusion reaction

研究代表者

藤原 晴美 (Fujihara, Harumi)

浜松医科大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：50643350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：輸血後の不規則抗体の陽性化について多施設共同研究を企画し、パイロット試験を実施した。輸血前の不規則抗体の陽性率は1.6%(5/307例)、輸血後は3.8%(10/263例)、1.9%(5例)で新規の不規則抗体が検出された。輸血量の平均値は、新規に不規則抗体が検出された群が 20 ± 14 単位で、非検出群の 7 ± 8 単位に比べ多かった($p=0.002$)。安全性や倫理面において、パイロット試験実施上で障害はなかった。その後、多施設共同研究を開始し、参加は9施設、355例から参加の承諾を得て研究を進めている。現在、輸血後の真の抗体陽性率と遅発性溶血性輸血副反応の発現率の調査をしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不規則抗体は、赤血球製剤(RBC)輸血により発現あるいは増加し、輸血をしたRBCと反応して遅発性溶血性輸血副反応(DHTR)の原因となりうる。イギリスでは年間26例の発生、日本ではDHTRが原因の死亡例が報告された。安全な輸血療法を実施していく上で、DHTRの実態を把握することは重要である。しかし現在、輸血後に不規則抗体検査はしないため、DHTRの発生率は不明である。本研究はDHTRの真の発生頻度と原因因子を解明するため、国内の施設でRBC輸血後に不規則抗体検査を実施し、輸血後に発現する不規則抗体の種類と検出率、発現に影響する因子、不規則抗体発現から消失までの経時的変化を前方向的に追跡調査した。

研究成果の概要(英文)：We planned a multicenter prospective study to examine the seroconversion of irregular antibodies after transfusion. First, we conducted the pilot study. Irregular antibodies were detected in 1.6% (5/307 cases) and 3.8% (10/263 cases) of cases before and after transfusion, respectively. New antibodies were detected in 1.9% (5 cases) of cases after transfusion. The mean amount of erythrocytes transfused (units) to those in whom new antibodies were detected (20 ± 14 units) was significantly greater than that of all other patients (7 ± 8 units) ($p = 0.002$). No safety or ethical problems were observed in this pilot study. After that, we started multicenter prospective study with 9 institutions and written informed consent was obtained from 307 cases. Now, we are prospectively investigating causal factor and true frequency of delayed hemolytic transfusion reaction.

研究分野：輸血・細胞治療

キーワード：輸血 赤血球不規則抗体 多施設共同研究 前方向性研究

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

イギリスの The Serious Hazards of Transfusion (SHOT)によると、2015年に遅発性溶血性輸血副反応 (Delayed hemolytic transfusion reaction : DHTR) は26症例、死亡は1症例発生している¹⁾。日本でも DHTR が原因となった死亡症例が報告された²⁾。通常、不規則抗体検査は赤血球製剤 (RBC) の輸血前に実施するが、輸血後に実施しない。不規則抗体を同定せず DHTR の診断を下すことは難しいため、DHTR は見逃されている可能性があり、SHOT の報告以上に発生しうる³⁾。

また、RBC 輸血直前の不規則抗体が検出感度以下となることがあり、現在の輸血治療では DHTR の発生率を正確に把握し、これを防ぐことは困難である。不規則抗体の情報と DHTR の交絡因子を詳細に検討することは、安全な輸血療法を患者に提供する上で重要である。このため、多施設共同研究を実施し、輸血後多数例を前方向的に解析することができれば、DHTR の交絡因子を明らかにできる。

2. 研究の目的

(1) パイロット試験の実施：RBC 輸血後の研究対象者に不規則抗体検査を実施し、輸血後に発現した不規則抗体の種類と検出率、不規則抗体の出現から消失までの経時的变化、関連因子を調査する多施設共同研究を実施するためのパイロット試験を実施する。

(2) 多施設共同研究の開始：Prospective な研究過程で発生するバグ、施設の協力体制や倫理面の問題点の抽出と整理を行い、プロトコルを修正し、多施設共同研究を開始する。

3. 研究の方法

(1) パイロット試験の実施

【対象】

参加施設内で1回目のRBCの輸血を実施し、不規則抗体検査の追跡調査に関し、書面にて informed consent (IC) を取得した者とした。

【不規則抗体の検査】

不規則抗体検査は、輸血前に実施した同種抗体 (抗 D, C, E, c, e, f, Ce, M, N, S, s, Lea, Leb, Jka, Jkb, Jk3, Fya, Fyb, P1, Dia, Dib, Jra, KANNO, Mia-related, K, k, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb, Lua, Lub, Xga, H) の有無と種類についての情報を収集した。輸血後の検体は、輸血の終了日から30-90日後の診療の際に採血した残余血清を使用した。この間に検体が得られない場合は、それ以降の最も早い受診日の残余血清を使用した。輸血後の不規則抗体検査は原則1回で、陽性化した例はそれ以降にも複数回検査した。

不規則抗体が検出された被検者には、不規則抗体保有カードを渡し、このカードの有用性を説明した。

【不規則抗体の陽性化に影響を及ぼす因子の調査】

不規則抗体の陽性化に影響を及ぼす背景因子として、性別、年齢、原疾患、過去の輸血歴、輸血量、輸血回数 (1日の輸血を1回と計数)、輸血の終了日から最初に不規則抗体検査を実施するまでの期間を調査した。

パイロット試験は、浜松医科大学の倫理委員会 (IRB) の承認を得て実施した (15-140)。

(2) 研究上の問題点の抽出と完成度の高い多施設共同研究プロトコルの作成・研究の開始

パイロット試験の実施における、倫理面を含む問題点について抽出した。多施設共同研究用にプロトコルを改訂した。多施設共同研究は、浜松医科大学の倫理委員会 (IRB) の承認を得て実施した (18-171)。

多施設共同研究の参加募集は、大学病院輸血部会議で実施した。参加施設は、多施設共同研究用のプロトコルを参加施設の倫理委員会に提出し、承認を得た後、研究を開始した。

4. 研究成果

(1) パイロット試験の実施・研究上の問題点の抽出

参加の承諾は307例から得られ、輸血後263例に不規則抗体検査がのべ267回実施された。輸血前の不規則抗体の陽性率は1.6% (5/307例)、輸血後の陽性率は3.8% (10/263例)、1.9% (5例) で新規の不規則抗体が検出された (Table 1)。今回のパイロット試験で、検査の実施時期や調査対象の差異により、不規則抗体の陽性率に幅があることが確認された。

Table 1

Alloantibody	Cases after transfusion (n = 263)						p**
	Total	Positive		Negative	Unresponsive		
		Newly detected after transfusion	Detected before transfusion				
All	10 (3.8%)	5 (1.9%)	5 (1.9%)	253 (96%)	258 (98%)		
Sex	Male	4 (3.6%)	1 (0.9%)	3 (2.5%)	107 (96%)	110 (96%)	0.45
	Female	6 (3.9%)	4 (2.7%)	2 (1.4%)	146 (96%)	148 (96%)	
Age	Mean ± SD	66 ± 13	62 ± 17	70 ± 6	63 ± 17	63 ± 17	0.83
	Median (range)	71 (33–76)	68 (33–75)	71 (61–76)	66 (15–88)	67 (15–88)	
History of blood transfusion (in another hospital)	Yes	4	1	3	35	38	0.51
	No	5	4	2	196	198	
	Unknown	1	0	0	32	32	
Number of RBC units	Mean ± SD	18 ± 23	20 ± 14	16 ± 31	7 ± 6	7 ± 8	0.002
	Median (range)	8 (2–72)	13 (8–40)	2 (2–72)	4 (2–44)	4 (2–72)	
Number of RBC transfusions*	Mean ± SD	9 ± 12	10 ± 7	8 ± 16	3 ± 3	3 ± 3	0.18
	Median (range)	2 (1–3)	2 (1–3)	1 (1–2)	1 (1–9)	2 (1–9)	

*Number of RBC transfusions: Multiple transfusions in one day were counted as one.

Positive: Cases in which irregular antibodies were detected. Negative: Cases in which irregular antibodies were not detected.

Unresponsive: Cases whose irregular antibody results did not change before and after transfusion.

**Newly detected cases vs unresponsive cases

輸血後に不規則抗体が検出された症例を Table 2 に示す。新規に不規則抗体が検出された症例は、抗 C が 1 例、抗 Jk^a が 1 例、抗 E+抗 c が 1 例、抗 E が 2 例であった。RBC の輸血量は、新規に不規則抗体が検出された群 (n=5, mean ± SD : 20 ± 14 単位, Median : 13, Range : 8–40) が、その他の群 (n=258, 7 ± 8 単位, 4, 2–72) より有意に多かった (p=0.002) ⁴⁾。

Table 2

Case	Post-1*	Post-2	Post-3	Post-4	Post-5	Post-6**	Post-7**	
Sex	F	F	F	F	M	M	M	
Primary disease	Myocardial infarction	Placenta accreta	Acute aortic dissection	Aorto-esophageal fistula	Rupture of an abdominal aortal aneurysm	Bile duct cancer	Myocardial infarction	
Alloantibody specificity	Before transfusion	Anti-e	No	No	No	No	No	
	After transfusion	Anti-C, e	Anti-Jk ^a	Anti-E, c	Anti-E	Anti-E	Anti-Le ^a	
	Examination period (days)	100	96	Anti-E: 49 Anti-c: 232	40	61	37	131
Age	60s	30s	70s	60s	70s	70s	70s	
History of blood transfusion (in another hospital)	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	
Pregnancy history	Yes	Yes	Yes	Yes				
Number of RBC units	Total units	8	8	13	30	40	2	72
	Antigen-positive units	0	4	E: 7 c: 9	11	30	0	12
Number of RBC transfusions	2	1	2	2	1	1	2	
Other	PC: 10 units							

New irregular antibodies were detected in Post-1–Post-5 cases.

*While anti-Le^a was previously detected only using the enzyme test in Post-6 and Post-7, it was not detected just before transfusion.

(2) 研究上の問題点の抽出と完成度の高い多施設共同研究プロトコルの作成・研究の開始
パイロット試験では、輸血が及ぼす不規則抗体発現に関する研究を実施する上で、安全性や倫理面で障害となる事項は認められなかった。このため、パイロット試験のプロトコルを基に以下の事項を改定し、多施設共同研究のプロトコルを作成した。

【パイロット試験での課題と解決策】

赤血球は抗原ごとに免疫原性が異なるため、同じ輸血量でも不規則抗体別に比較すると、陽性率に差異が生じる可能性がある。多施設共同研究で多数例を前方向に解析し、輸血量に伴う各不規則抗体の陽性率を明らかにすることを研究の目的に追記した。

パイロット試験では、輸血後の検査で複合抗体検出例、陰性化例が確認された。多施設共同研究では、不規則抗体の陽性例を追跡し、複合抗体の検出時期と陰性化の有無について調査できるよう方法を改定した。

輸血後に不規則抗体が陽性化した被検者は、DHTR 発症の有無について調査するよう方法に追記した。

パイロット試験では、RhD 陰性者が輸血後に抗 D を検出された例は認められなかった。アジア人には、RhD 抗原が極めて少ない DEL の保有者がいる。DEL を保有する献血者の RBC は RhD 陰性と判定されるため、DEL の輸血後に抗 D が検出される可能性がある。このため、RhD 陰性の RBC 輸血後の抗 D の陽性率、陽性化に影響する因子についても情報収集をすることとした。

多施設共同研究は、浜松医科大学の倫理委員会（IRB）の承認を得て実施した（18-171）。本研究は介入を伴わない研究であるが、大学病院医療情報ネットワークの公開登録システム（UMIN-CTR：UMIN000036980）に登録した。

共同研究機関は、全国大学病院輸血部会議 技師研究会、日本赤十字社血液事業本部、参加施設の募集は全国大学病院輸血部会議にて行い、2020年3月現在9施設の大学病院と共に研究を実施し、355例を登録している。

<引用文献>

1. Serious Hazards of Transfusion (SHOT) ホームページ
<https://www.shotuk.org/wp-content/uploads/myimages/SHOT-2015-Annual-Report-Web-Edition-Final-bookmarked-1.pdf> (2020年5月現在)
2. Hatano Y, Otsuka S, Chousa M, Saito S, et al: Fatal delayed hemolytic transfusion reaction associated with anti-Dib and anti-E. *Transfus Apher Sci*, 47: 263–8, 2012.
3. Heddle NM, Soutar RL, O'Hoski PL, Singer J, et al: A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *Br J Haematol*, 91: 1000–1005, 1995.
4. 櫻木美基子, 清川知子, 細川美香, 梶山ともみ, 他: 輸血後不規則抗体陽性化症例の臨床経過についての検討. *日本輸血細胞治療学会誌*, 59: 579–585, 2013.
5. 藤原晴美, 石塚恵子, 渡邊弘, 古牧宏啓, 他: 輸血後の赤血球不規則抗体発現に関する前方向性研究 -パイロット試験の結果-. *日本輸血細胞治療学会誌*, 65: 810–816, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 藤原晴美、石塚恵子、渡邊弘子、古牧宏啓、山田千亜希、芝田大樹、榛葉隆人、砂子桃子、根本直紀、猪野楓、小沢茜香里、小幡由佳子、竹下明裕	4. 巻 65 (5)
2. 論文標題 輸血後の赤血球不規則抗体発現に関する前方向性研究 パイロット試験の結果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy	6. 最初と最後の頁 810-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3925/jjtc.65.810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Furumaki, Akihiro Takeshita, Chiaki Yamada, Harumi Fujihara, Keiko Ishizuka, Hiroki Shibata, Takahito Sinba, Momoko Sunako, Naoki Nemoto, Kaede Ino, Akari Ozawa, Hiroko Watanabe, Yukako Obata.
2. 発表標題 Optimum DTT Concentration and Treatment Time for CD38 Inactivation on RBCs Analyzed By a Newly-Devised Flow Cytometric Antibody Binding Assay
3. 学会等名 61st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原晴美、芝田大樹、榛葉隆人、都築茉里子、古牧宏啓、山田千亜希、石塚恵子、渡邊弘子、朝比奈彩、小幡由佳子、竹下明裕
2. 発表標題 新生児の血液型ウラ検査における抗A、抗B反応強度の測定に関する考察
3. 学会等名 第66回 日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田千亜希、竹下明裕、藤原晴美、古牧宏啓、芝田大樹、奥田誠、川畑絹代、万木紀美子、前川平、岡崎仁、大戸音
2. 発表標題 Daratumumab投与における輸血検査への影響とその対処法
3. 学会等名 第66回 日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古牧宏啓, 竹下明裕, 藤原晴美, 山田千亜希, 芝田大樹, 奥田誠, 川畑絹代, 万木紀美子, 前川平, 岡崎仁, 大戸斉
2. 発表標題 フローサイトメトリーを用いたDaratumumabによるCD38抗原の感作と処理に関する検討
3. 学会等名 第66回 日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古牧宏啓, 山田千亜希, 都築茉里子, 榛葉隆人, 芝田大樹, 藤原晴美, 石塚恵子, 渡邊弘子, 朝比奈彩, 小幡由佳子, 竹下明裕
2. 発表標題 自己血採血患者に対して事前に行う輸血部門からの情報提供の有用性
3. 学会等名 第66回 日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原晴美, 渡邊弘子, 榛葉隆人, 都築茉里子, 保坂侑里, 古牧宏啓, 芝田大樹, 石塚恵子, 山田千亜希, 小幡由佳子, 竹下明裕
2. 発表標題 赤血球不規則抗体産生に関するprospective研究と課題
3. 学会等名 第65回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榛葉隆人, 山田千亜希, 保坂侑里, 都築茉里子, 古牧宏啓, 芝田大樹, 藤原晴美, 石塚恵子, 渡邊弘子, 竹下明裕
2. 発表標題 輸血部門が行う輸血説明に際して患者側より受けた質問の頻度と内容
3. 学会等名 第65回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 保坂侑里, 山田千亜希, 芝田大樹, 榛葉隆人, 都築茉里子, 古牧宏啓, 藤原晴美, 石塚恵子, 渡邊弘子, 室井一男, 竹下明裕
2. 発表標題 高校生献血のきっかけに関する意識調査
3. 学会等名 第65回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田千亜希, 榛葉隆人, 藤原晴美, 古牧宏啓, 芝田大樹, 都築茉里子, 石塚恵子, 渡邊弘子, 小幡由佳子, 深水秀一, 竹下明裕
2. 発表標題 多血小板血漿 (PRP) を用いた難治性皮膚潰瘍治療
3. 学会等名 第70回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考